ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

ANNEE 1961 N° 27

LES ANTIBIOTIQUES DANS LE LAIT

Incidence de leur Activité dans l'Industrie Fromagère

THESE

pour le doctorat vétérinaire

(Diplôme d'Etat)

Présentée et soutenue publiquement en Juin 1961

devant la

Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Toulouse

PAR

Guy, André, Auguste, Eugène LEBARBE

Né le 23 Octobre 1931, à Orbec (Calvados)

Président : M. ANDRIEU, Professeur à la Faculté de Médecine de Toulouse

Assesseurs { M. GODFRAIN, Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse
M. SAURAT, Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

---

IMPRIMERIE PARISIENNE
16, Place du Salin, 16
TOULOUSE
—
1961

LES ANTIBIOTIQUES DANS LE LAIT

Incidence de leur Activité dans l'Industrie Fromagère

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

ANNEE 1961 N° 27

LES ANTIBIOTIQUES DANS LE LAIT

Incidence de leur Activité dans l'Industrie Fromagère

THESE

pour le doctorat vétérinaire

(Diplôme d'Etat)

Présentée et soutenue publiquement en Juin 1961

devant la

Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Toulouse

PAR

Guy, André, Auguste, Eugène LEBARBE

Né le 23 Octobre 1931, à Orbec (Calvados)

Président : M. ANDRIEU, Professeur à la Faculté de Médecine de Toulouse

Assesseurs { M. GODFRAIN, Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse
M. SAURAT, Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

---

IMPRIMERIE PARISIENNE
16, Place du Salin, 16
TOULOUSE
—
1961

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE

ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

	MM.
Directeur	PONS.
Professeur Honoraire	LASSERRE.

PERSONNEL ENSEIGNANT

PROFESSEURS

Physique et Chimie Biologique Pharmacie et Toxicologie Hygiène du Lait	GODFRAIN.
Anatomie descriptive - Extérieur Anatomie appliquée	BLIN.
Physiologie et Thérapeutique Pharmacodynamie	LE BARS.
Histologie - Embryologie Anatomie Pathologique Inspection des Viandes	LOMBARD.
Zoologie appliquée - Botanique Parasitologie Externe Parasitologie Interne	BRIZARD.
Pathologie médicale des Equidés et Carnivores Législation Vétérinaire	DARRASPEN.
Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour	TOURNUT.
Technique chirurgicale Pathologie chirurgicale	PUGET.
Pathologie de la Reproduction Obstétrique	BERTHELON
Microbiologie - Immunologie Maladies Contagieuses Police sanitaire	SAURAT.
Ethnologie Hygiène Agronomie Alimentation Zootechnie Economie rurale	PONS

CHEFS DE TRAVAUX

Maladies Contagieuses	LAUTIÉ, Agrégé.
Zootechnie	FALIU, Agrégé.
Pathologie Médicale - Législation Vétérinaire	LESCURE. Agrégé.
Anatomie Pathologique	GOULARD.
Pathologie Chirurgicale	CAZIEUX.
Pathologie de la Reproduction	ROYAL.
Chimie	MILHAUD.

COURS COMPLEMENTAIRES
CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Radiologie	AUVERGNAT
Droit Vétérinaire	LINON.
Botanique	MORQUER.
Pisciculture	SECONDAT.
Agronomie	BRISEBOIS.
Economie Rurale	MONTANÉ DE LA ROQUE.

ASSISTANT

Pathologie Médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour	LACAZE.

La Faculté et l'Ecole déclarent n'être pas responsables des opinions émises par les candidats (Délibération de la Faculté, en date du 10 mai 1891 et du Conseil de l'Ecole. en date du 13 juin 1924).

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

A MES PARENTS

Pour les sacrifices qu'ils ont consentis et la compréhension qu'ils m'ont manifestée.

Qu'ils trouvent ici l'expression de mon amour filial.

A MA FEMME

Dont l'affectueuse sollicitude fut pour moi le meilleur stimulant.

A MON FILS

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR ANDRIEU

Professeur à la Faculté de Médecine.

Qui nous a fait le très grand honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

A NOTRE JURY DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR GODFRAIN

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse.

Guide bienveillant et sûr, qui a largement contribué à la réalisation de cette thèse.

Qu'il trouve ici l'expression de notre reconnaissance.

MONSIEUR LE PROFESSEUR SAURAT

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse.

Qui fut toujours pour nous un maître compréhensif et indulgent.

Hommage respectueux.

A TOUS NOS MAITRES

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546522_0039

INTRODUCTION

L'introduction de la pénicilline dans l'arsenal thérapeutique du vétérinaire a marqué une date dans la médecine des animaux. Tout naturellement on a essayé son activité sur la plupart des affections auxquelles se heurte le plus couramment le vétérinaire. Parmi celles-ci les mammites, excessivement répandues dans le cheptel français, ne pouvaient manquer de retenir l'attention.

En effet, d'après Rey dans « Technologie laitière », Drieux estime à un million cinq cent mille le nombre des vaches mammiteuses. Thieulin estimait, en décembre 1951, que le défaut de production résultant en France de cette maladie entraîne actuellement pour les producteurs un manque à gagner dont l'ordre de grandeur peut être estimé à sept ou huit milliards de francs par an. En dehors de cette perte brutale, il convient de mentionner le déficit également causé lors des transformations industrielles fromagères et même beurrières, du fait des laits dont la composition modifiée provoque des coagulations et maturations anormales, c'est-à-dire l'obtention de produits de qualité inférieure ou franchement mauvaise, aux rendements inconstants.

Du point de vue de l'industrie laitière, les laits mammiteux les plus redoutables ne sont pas ceux qui proviennent de mammites aiguës. Ceux-ci, en effet, sont

facilement décelables par des signes cliniques évidents, soit à l'étable sur la vache ou le lait de traite, soit à la laiterie par des opérations élémentaires de contrôle des laits. Plus redoutables et plus répandues également sont les infections latentes de la mamelle. Dans ces maladies chroniques, les signes cliniques sont nuls, le lait est apparemment normal. Toujours difficiles à dépister par les moyens de contrôle usuels, ces laits de mammite, couramment mélangés aux laits sains dans les livraisons, font courir aux fabricants des risques constants : maturations défectueuses en beurrerie, coagulations difficiles et égouttages anormaux en fromagerie, instabilité des laits concentrés.

Ces mauvais laits échappent ordinairement à l'attention du producteur, même consciencieux. La mamelle paraît saine, le lait normal. Les contrôles usuels de laiterie (acidité, triage à l'alcool...) sont aussi souvent négatifs, d'autant plus qu'ils s'effectuent sur des laits de mélange. Certaines épreuves bactériologiques (recherches des germes pathogènes ou diastasiques, indice de catalase) se montreraient probantes, mais leur application n'est pas du domaine courant.

Aussi on devine combien l'apparition sur le marché de la pénicilline, puis d'antibiotiques divers directement injectables dans la mamelle, fut suivie très rapidement par la mise en œuvre largement étendue de ce mode de traitement nouveau. L'usage en est maintenant généralisé.

La pénicilline, en particulier, est très fréquemment utilisée pour combattre les mammites contagieuses. Dès 1944, Kakavas, aux Etats-Unis [13], met en relief les premiers grands succès du nouveau traitement. Depuis

lors, différentes combinaisons d'auréomycine, de streptomycine, de chloramphénicol, de terramycine et de néomycine ont été essayées.

Mais les solutions à d'anciens problèmes en créent souvent de nouveaux et l'introduction des antibiotiques employés comme remède efficace contre la mammite ne fait pas exception à la règle. Le présent travail se propose surtout d'exposer certaines conséquences inattendues que les « laits à la pénicilline » entraînent dans les industries de transformations du lait.

Dès 1947, en Suède et au Danemark, on remarque que des bactéries des levains lactiques servant à la préparation des laits acidifiés, à la maturation des crèmes et à la fabrication du fromage poussent mal — et quelquefois pas du tout — dans un lait contaminé par les antibiotiques. La profession laitière est mise en garde contre ce nouveau danger. En France, JACQUET et ses collaborateurs [8] étudient en 1950-51 les accidents provoqués en fabrication de camemberts par la présence de pénicilline dans le lait.

Depuis cette date, le problème est toujours à l'ordre du jour en dépit des travaux consacrés à son étude. Nous essaierons de faire le point de la question en son état actuel et de présenter les moyens de protection qui ont pu être envisagés.

CHAPITRE PREMIER

NOTION DE TECHNOLOGIE FROMAGÈRE

I. Principes importants de la fabrication du fromage

Que le fromage soit préparé dans le désert du Sahara par des tribus nomades ou dans les usines garnies de carreaux de faïence et de matériel en acier inoxydable d'Europe ou des Etats-Unis, les six étapes suivantes restent fondamentales :

1° le caillage du lait,
2° le découpage du caillé,
3° la cuisson du caillé,
4° le salage,
5° l'égouttage,
6° le pressage.

Ces principes de base sont les mêmes depuis vingt siècles et restent valables de nos jours, malgré les méthodes de fabrication améliorées, les matériels et instruments nouveaux. Toutefois, ces différentes opérations constituant les étapes essentielles de la fabrication peuvent être difficiles à séparer les unes des autres. Par

exemple, dans une fabrication de caractère primitif, le lait est mis à cailler spontanément dans un sac en peau de chèvre, en ajoutant parfois un fragment d'estomac pour hâter la coagulation; le caillé est brisé par un massage convenable du sac; ensuite, dans le sac maintenu au chaud, les fragments de caillé se séparent du lacto-sérum et on les recueille pour les sécher au soleil et les piler dans un récipient approprié en les mélangeant avec du sel.

Si un facteur quelconque apporte une perturbation dans l'une de ces étapes, la fabrication pourra être gravement compromise ou même impossible. Pour le fabricant, l'accident apparaît le plus souvent dès la première phase, au moment de la coagulation du lait dans les cuves à fromage: retard à la coagulation, absence ou insuffisance de formation d'acide lactique. Cette production d'acide lactique conditionne la vitesse de séparation du caillé et du sérum, ainsi que la croissance des différents groupes de micro-organismes, utiles ou nuisibles pendant l'égouttage et la maturation.

La vitesse de formation de l'acide lactique dépend des propriétés nutritives du lait, considéré comme milieu de culture pour les bactéries lactiques. On a remarqué depuis longtemps que la fabrication normale du fromage se trouve ralentie et que les défauts apparaissent lorsque certains laits ne possèdent pas les qualités d'un bon milieu de culture, favorable au développement des ferments lactiques. Ces observations font apparaître la présence d'éléments inhabituels dans les laits considérés et ont donné naissance à la notion de *substances inhibitrices.*

II. Propriétés inhibitrices du lait

Tout ce qui est susceptible de s'opposer au développement de la flore microbienne normale dans un produit laitier fermenté, présente une importance primordiale en industrie laitière.

Ces phénomènes d'inhibition ont fait l'objet d'études nombreuses, mais bien que d'observation assez ancienne, l'analyse complète de leur processus est loin d'être complètement terminée. On a pu cependant mettre en évidence certaines modalités d'action et l'existence même de ces substances.

a) *Variations saisonnières des propriétés inhibitrices du lait*

La croissance des levains lactiques dans le lait est meilleure en été, lorsque les vaches sont au pâturage, qu'en hiver pendant la période de stabulation : cette observation a été faite aussi bien dans l'hémisphère Nord que dans l'hémisphère Sud.

Ces variations saisonnières existent pour toutes les souches de bactéries lactiques et quels que soient la nature du lait ou le traitement thermique qu'il a pu subir.

b) *Souches résistantes et souches sensibles*

D'autres observations ont montré que certaines souches de streptocoques lactiques appartenant aux espèces *Str. cremoris* et *Str. lactis* étaient inhibées par une ou plusieurs substances présentes dans le lait cru. Cultivées sur le lait cru, ces souches ne forment au bout de six heures

d'incubation à 30°C, qu'une faible quantité d'acide lactique, alors que sur lait bouilli ou autoclavé la vitesse de formation de l'acide est normale.

Jago [11] désigne de telles souches sous le nom de souches sensibles. D'autres souches de streptocoques, les souches résistantes, se développent sur lait cru à la même vitesse que sur le lait bouilli ou autoclavé.

Lorsqu'une souche résistante et une souche sensible sont employées séparément pour la fabrication du fromage on apprécie facilement la différence manifeste entre les vitesses d'acidification.

c) *Nature des substances inhibitrices du lait*

Les études menées depuis 1930 ont permis de mettre en évidence les principaux facteurs d'inhibition : lacténines, substances inhibitrices naturelles probablement de nature enzymatique, autres que la lacténine, bactériophages, substances inhibitrices formées par les bactéries lactiques, antiseptiques, antibiotiques.

Notre propos sera ici l'étude particulière de l'influence des antibiotiques dans le lait cru sur les fabrications fromagères.

CHAPITRE II

LES ANTIBIOTIQUES DANS LE LAIT

I. Voies d'introduction des antibiotiques dans le lait

Les antibiotiques injectés par voie parentérale ne semblent pas s'éliminer par le lait, ou les quantités éliminées sont suffisamment faibles pour pouvoir être considérées comme négligeables, quant aux conséquences pratiques de leur présence.

Malheureusement, dans les cas de mammite, ce mode de traitement s'est avéré nettement insuffisant et l'antibiotique doit être injecté dans le canal du trayon de la mamelle infectée.

Cette technique entraîne inévitablement une contamination du lait par les antibiotiques.

On pourrait penser également à l'addition de pénicilline ou de tout autre antibiotique au lait, afin d'augmenter ses chances de conservation. Mais si la pénicilline a une action inhibitrice pour les streptocoques lactiques, elle est sans action sur les germes gram négatif, pseudomonas

ou coliformes, qui contaminent de nombreux laits. Son emploi risquerait donc d'être dangereux en favorisant la pullulation sélective des germes pénicillo-résistants du groupe des Salmonellas.

Cette utilisation est à déconseiller et comme elle ne semble pas avoir connu beaucoup de faveur en France, nous l'ignorerons dans cette étude. La quantité d'antibiotique qui passe dans le lait des vaches traitées est variable, même lorsque les vaches en ont reçu la même dose. Les observations de la Station danoise de Recherches laitières (1951) indiquent que la pénicilline trouvée dans le lait douze heures après le traitement peut atteindre de 5 à 20 unités internationales par millilitre de lait. L'unité internationale pour la pénicilline correspond à 0,6 microgramme de pénicilline G sodique pure cristallisée.

Les principaux facteurs responsables des variations observées sont :

a) les caractéristiques individuelles et l'état sanitaire de la vache et de la mamelle;

b) la quantité d'antibiotique injectée;

c) la quantité de lait produite;

d) la forme sous laquelle l'antibiotique est préparé.

La façon dont l'antibiotique injecté diffuse dans le lait varie également entre chaque quartier de la même mamelle, aussi largement qu'elle le fait d'un animal à l'autre. On a montré, d'autre part, que les mamelles saines laissent passer plus de pénicilline que les mamelles infectées.

Les doses thérapeutiques d'antibiotiques comme la

pénicilline représentent dans les cas habituels 25 000 à 100 000 U.I. par quartier, mais peuvent atteindre 1 000 000 d'unités. L'auréomycine et la streptomycine sont appliquées à raison de 200 à 500 mg par quartier. La dose influe directement sur la quantité d'antibiotique excrétée dans le lait.

Une faible production de lait, résultant de différentes causes, telle que la fin de la période de lactation, correspond pour les vaches traitées à une forte dose d'antibiotique dans le lait. En général, les animaux traités dans un troupeau d'importance moyenne excrètent dans le lait environ 50 % de la pénicilline ou de tout autre antibiotique injecté, mais dans certains troupeaux on constate des variations très importantes de part et d'autre de ce chiffre. C'est ainsi qu'une étude faite au Danemark sur ce sujet (Hovmand, Jepsen et Overby) [6] a permis d'observer qu'un troupeau de vaches éliminait seulement 2,7 à 15,7 % de la pénicilline administrée, alors qu'un autre troupeau en éliminerait de 72,0 à 84,0 %. Le type de la préparation exerce une influence primordiale sur la rétention de l'antibiotique dans la mamelle. Certaines préparations contiennent des substances retardatrices, telles que le monostéarate d'aluminium et la procaïne (pénicilline-retard). Ces substances retiennent la pénicilline dans la mamelle pendant un temps plus long et permettent ainsi son évacuation dans le lait pendant un temps également plus long.

C'est ainsi que W. F. Jackson et C. S. Bryan étudiant les concentrations de pénicilline dans le lait consécutives à l'instillation de plusieurs formes de cet antibiotique aux différentes périodes de lactation, ont noté qu'avec des doses de 25 000 U.I. sous n'importe quelle forme,

des concentrations mesurables étaient toujours décelées à la 24e heure. En utilisant la pénicilline procaïnée en suspension huileuse avec le monostéarate d'aluminium ils ont obtenu des niveaux mesurables sur une plus longue période : pour 300 000 U.I. des quantités mesurables existaient jusqu'à la 72e heure, au début de la lactation, et jusqu'à la 192e heure au milieu de la lactation.

II. Durée nécessaire pour l'élimination des antibiotiques dans le lait

Il est difficile de prévoir après un traitement la quantité exacte d'antibiotique qui passera dans le lait au cours des différentes traites. On a pu établir cependant certaines données générales basées sur des essais effectués avec des antibiotiques déterminés : Jepsen et Overby [12], employant la pénicilline, ont pu noter les faits suivants :

a) La pénicilline est principalement évacuée lors des deux premières traites, après le traitement, dans la proportion de 30 à 80 % de la quantité injectée. En moyenne le lait des deux premières traites contient 50 % de la pénicilline injectée.

Ainsi une injection d'environ 25 000 unités de pénicilline, sans substances retardatrices, conduit à une dose relativement forte dans le lait de la première traite qui suit le traitement (en moyenne 5 U.I./ml) à une dose relativement faible à la deuxième traite (en moyenne 0.2 U.I./ml), et à la disparition à peu près totale de la pénicilline à la troisième traite.

b) Si l'on adjoint à la même dose de pénicilline des substances retardatrices, on obtient une forte teneur en pénicilline dans le lait de la première et de la deuxième traite (en moyenne 3 U.I. par ml), une teneur relativement faible à la troisième traite (en moyenne 0,1 à 1 U.I./ml) et des teneurs voisines de zéro à partir de la sixième traite.

Le Professeur Terroine résume ainsi les connaissances acquises. Lors de la première traite qui suit l'injection, le lait contient de 1 000 à 10 000 U.I./litre... ; avec les solutions aqueuses de pénicilline, l'élimination est généralement complète en 36 heures (trois traites) ; ... avec les suspensions huileuses, au contraire, on retrouve des quantités mesurables d'antibiotiques après 60 heures et, très souvent, il en existe encore après 84 heures, c'est-à-dire que le lait reste dangereux pour la fromagerie pendant quatre à cinq jours après l'injection.

D'après Moret, pour un protocole thérapeutique comportant deux injections intramammaires de 200 mg d'auréomycine à 48 heures d'intervalle, les moyennes s'établissent comme suit (en γ/millilitre de lait, les échantillons de lait étant prélevés sur l'ensemble de la traite) :

Temps écoulé (en heure) après le traitement....	10	24	34	48	58	72	82	96	106
Concentration en γ/ml lait.....	48	26	15,5	11,5	8	4	3	2,5	2,12

J. A. Overby [22], poursuivant ses travaux en utilisant successivement l'auréomycine, la terramycine, la strepto-

mycine, la chloromycétine, étudie l'activité antibiotique des laits de première traite: la concentration en auréomycine est telle qu'une addition seulement de 2 % de ce lait à un lait normal, a pu en arrêter entièrement l'acidification.

Le même résultat fut obtenu avec 5 % de lait à la streptomycine, 10 % de lait à la pénicilline ou à la terramycine, et 40 % de lait à la chloromycétine.

L'auteur recommande en conséquence de suspendre les livraisons de lait des vaches traitées pendant :

2 jours pour la chloromycétine,

3 jours pour la streptomycine et terramycine.

4 jours pour l'auréomycine.

Ceci vient corroborer les constatations faites dans la pratique courante selon lesquelles la fabrication du camembert est impossible avec du lait provenant de traites effectuées cinq et même six jours après le traitement.

Il faut donc se défier du délai de 72 heures fixé par le fabricant pour pouvoir utiliser le lait.

En la matière, nous ferons nôtre l'opinion exprimée par Dejambe et Mocquot : « avec les suspensions huileuses, il faut attendre cinq jours après le dernier traitement pour que le lait soit indemne ».

III. Conséquence des traitements : Les laits antibiotés

La présence d'un antibiotique dans le lait a des répercussions sur l'homme qui consomme le lait : création

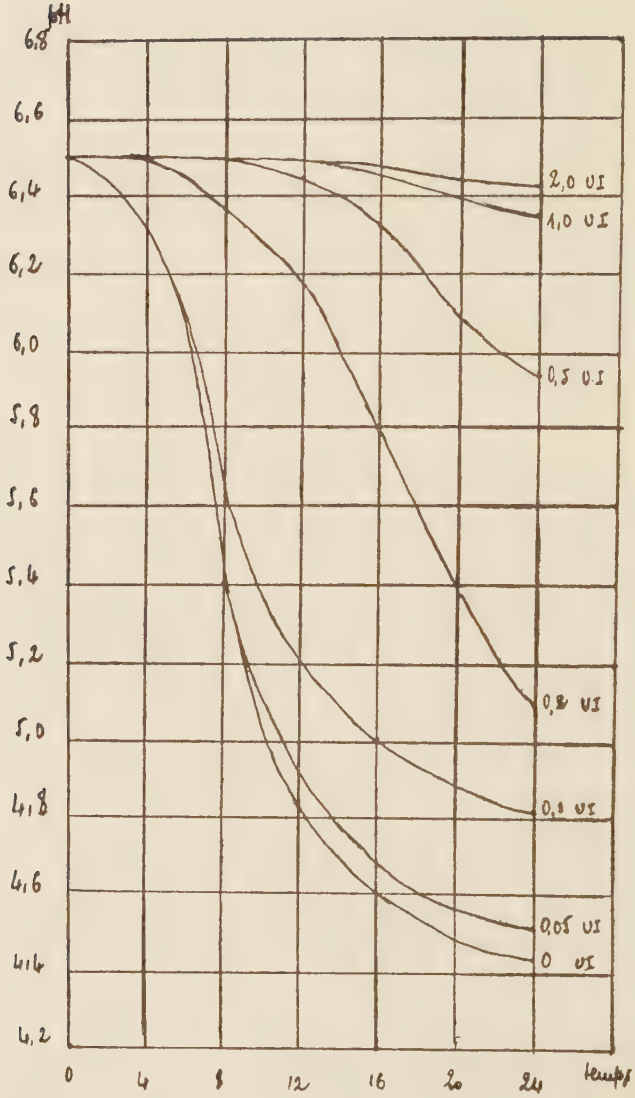
de souches microbiennes résistantes dans le contenu intestinal, action destructrice des ferments lactiques de la flore intestinale (ce qui est vraiment préjudiciable à la santé de l'homme et notamment de l'enfant) et réactions allergiques.

Elle se répercute aussi malencontreusement sur la marche des fabrications industrielles à base de lait, particulièrement en fromagerie où elle agit comme inhibiteur des ferments lactiques.

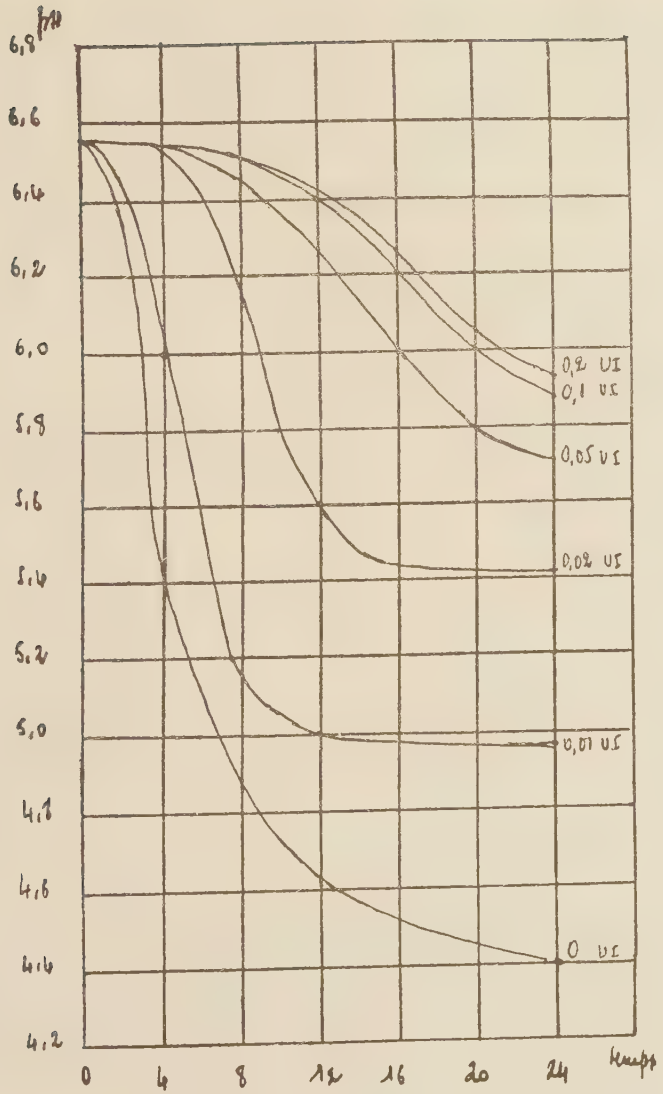
a) *Sensibilité des bactéries aux antibiotiques*

Les micro-organismes du fromage sont plus ou moins sensibles à la pénicilline, comme l'indiquent les nombreuses recherches effectuées dans ce domaine. Les bactéries qui composent les levains lactiques habituels, sont déjà sensibles à une faible concentration de pénicilline: 0,05 U.I./ml. *Str. cremoris* est plus sensible que *Str. lactis*, lui-même plus sensible que *Str. fœcalis*. Les levains lactiques du commerce, composés de plusieurs souches, sont en général partiellement inhibés à des concentrations de 0,1 U.I./ml.

De même, les lactobacilles, à quelques exceptions près, sont plus résistants à la pénicilline que les streptocoques lactiques. Les lactobacilles peuvent ne présenter qu'une inhibition partielle à partir de 0,3 U.I./ml. Le plus sensible des lactobacilles est *L. bulgaricus* et le plus sensible des streptocoques est *Str. thermophilus*. Tous deux sont inhibés d'une manière significative dans leur production d'acide lactique et dans leur croissance, par des concentrations d'environ 0.01 U.I./ml de pénicilline (voir graphique).



pH d'un lait contenant de la pénicilline (en U.I./ml) et ensemencé avec *Str. cremoris*.



pH d'un lait contenant de la pénicilline (en U.I./ml) et ensemencé avec *Str. thermophilus.*

D'après K. E. Thomé et F. V. Kosikowski, on peut dresser le tableau suivant du seuil critique de la teneur en pénicilline du lait vis-à-vis de différents organismes :

MICRO-ORGANISMES UTILISÉS	TENEUR EN PÉNICILLINE PROVOQUANT UNE INHIBITION SIGNIFICATIVE DE LA CROISSANCE (U.I./ML)
Str. cremoris	0,05-0,10
Str. lactis	0,10-0,30
Streptocoques employés comme levain	0,10
Str. thermophilus	0,01-0,05
Str. fœcalis	0,30
L. bulgaricus	0,30-0,60
L. acidophilus	0,30-0,60
L. casei	0,30-0,60
L. lactis	0,25-0,50
L. helveticus	0,25-0,50
Leuc. citrovorum	0,05-0,10
Propionibacterium Shermanii	0,05-0,10

Les autres antibiotiques, bien que d'activité inégale, agissent sur les micro-organismes du fromage d'une manière analogue. H. Moret, étudiant l'action de l'auréomycine, note l'apparition d'une sensibilité des ferments lactiques à partir de 0,1 γ/ml de lait. Cette sensibilité s'affirme nettement pour une concentration de 0.2 γ/ml qui provoque une inhibition presque complète des ferments de la deuxième à la sixième heure.

Enfin, pour des concentrations de l'ordre de 1 γ/ml, l'acidification n'apparaît pratiquement pas.

Ces observations viennent confirmer les résultats obtenus par Overby [21] qui, étudiant l'effet de divers antibiotiques sur l'activité d'une culture à souches mélangées du commerce, arrive aux conclusions suivantes: les bactéries lactiques sont très sensibles à l'auréomycine et à la terramycine.

Ainsi, des proportions aussi faibles que 0,1 µg de terramycine ou 0,2 µg d'auréomycine par ml de lait peuvent inhiber la croissance des streptocoques lactiques. 1 µg d'auréomycine ou 2 µg de terramycine par ml de lait arrêtent complètement la croissance des bactéries. Pour atteindre les inhibitions correspondantes, le lait doit contenir respectivement 0,4 µg/ml et 10 µg/ml de streptomycine ou respectivement 2 µg/ml et 100 µg/ml de chloromycétine.

Les travaux poursuivis par le Professeur S. Ovejero. M. Diez et R. Pascual [20] font apparaître des résultats un peu différents, mais n'infirment en rien les conclusions précédentes. Ces auteurs ont conduit leurs expériences en fabrique de fromage « demi-dur Léonais » (de la province espagnole de Léon) dont la coagulation s'effectue normalement en 2 h 30. Ils ont constaté que des quantités de 0,25 U.I. à 0,50 U.I. de pénicilline par ml de lait n'influencent pas la fermentation de l'espèce de fromage élaboré. Les accidents apparaissent à 1 U.I./ml de lait. Ils ont ensuite procédé à l'étude de la sensibilité de la flore lactique de ces fromages en utilisant le test des disques en papier et des antibiotiques fabriqués par Difco Laboratories. Leurs conclusions permettent alors de classer par ordre d'activité décroissante l'auréomycine, la terramycine, la streptomycine, la chloromycétine et

la bacitracine dont la faible activité sur les ferments lactiques semble ouvrir d'intéressantes perspectives.

b) *Comment se manifestent les antibiotiques ?*

La présence d'antibiotiques dans le lait agit ou bien sur la formation d'acide lactique par les levains, ou directement sur la croissance des micro-organismes de la maturation.

Les antibiotiques contenus dans le lait persistent en effet dans le fromage pendant la période de maturation. Les micro-organismes de la maturation, y compris *L. casei*, sont cependant plus résistants aux antibiotiques que les levains producteurs d'acide lactique. Ceci ne résout d'ailleurs pas le problème, puisque toute atteinte, si faible soit-elle, à la production d'acide lactique par les levains, peut modifier de façon défavorable les processus normaux de la maturation. Une inhibition partielle des micro-organismes responsables de la maturation et sensibles aux antibiotiques, peut déclencher le développement de micro-organismes résistants à la pénicilline et capables d'entraîner dans le fromage, la formation de produits indésirables.

En Europe, de nombreux chercheurs (Jacquet [7], Meewes et Milosevic [17]) ont remarqué que les fromages de camembert contenant de petites quantités d'antibiotiques présentent une mauvaise croissance de la moisissure, un développement excessif des ferments du rouge, une production de gaz dans le fromage et un mauvais goût. Si l'on fabrique du Cheddar avec du lait de vaches traitées, le caillé est insuffisamment acide et favorise la croissance des bactéries coliformes avec pour

conséquence la production de gaz et un mauvais goût. Le gruyère présente, pour certains niveaux de concentration en antibiotique, un gonflement butyrique et pour d'autres niveaux une fermentation gazeuse due aux coliformes.

En règle générale et pour la plupart des fromages, de faibles concentrations de pénicilline dans le fromage donnent à ce dernier une mauvaise consistance, un goût défectueux allant du plat au putride, une production de gaz exagérée.

Ce phénomène, bien étudié en fromagerie de Camembert par J. Jacquet et ses collaborateurs [8], apparaîtrait dans les conditions suivantes :

Le lait de ramassage représente un produit naturellement riche en bactéries lactiques, mais aussi en germes coliformes (1 000 000 à 2 000 000 coli/ml). En fabrication fromagère normale, ce lait subit les processus d'acidification lactique pendant la période d'emprésurage (1 h 15 à 2 h), puis au cours du moulage et de l'égouttage. C'est cette fermentation lactique qui conditionne un bon égouttage du caillé. Pendant tout le cours de cette pullulation et de cette activité lactique massive, les colibacilles sont rapidement arrêtés, mis dans l'impossibilité de se multiplier et restent en état d'infériorité.

La présence d'antibiotiques dans le lait apporté à l'usine va modifier les équilibres habituels des flores microbiennes, en faveur des colibacilles, car les ferments lactiques vrais sont inhibés. Le caillage par la présure se fait normalement, mais l'égouttage, qui doit être favorisé par la fermentation lactique, s'effectue très mal. Les colibacilles, insensibles à l'action de la pénicilline,

n'ont plus pour les arrêter cette intense prolifération des ferments lactiques. Dans un milieu qui leur offre d'excellentes conditions d'humidité et de température, ils pullulent abondamment, présentant un métabolisme très actif, avec dégagement considérable de gaz qui font gonfler la pâte et donnent les multiples trous observés dans le caillé humide, mal égoutté.

D'ailleurs cette inhibition des ferments lactiques par les antibiotiques n'est pas surprenante si l'on considère la classification des bactéries lactiques établie par ORLA-JENSEN, car *Streptococcus mastiditis* ou *agalactiae*, responsable de la mammite contagieuse des vaches laitières, et *Str. pyogenes*, appartiennent au groupe des ferments lactiques (très voisin de *Str. cremoris*).

Si on emploie les antibiotiques pour détruire ce streptocoque spécial, qui n'est en fait qu'un germe lactique un peu particulier, pathogène, il n'y a pas de raison que ces produits n'agissent pas également sur les autres espèces de ferments lactiques vrais.

Le phénomène se montre proportionnel à la quantité d'antibiotique présent dans le lait : de faibles doses entraînent l'arrêt d'acidification au cours du caillage, mais l'acidification en cours d'égouttage se produit normalement. Des doses élevées commencent à retarder l'acidification en cours d'égouttage, mais cette action est momentanée. Si l'on augmente encore le taux d'antibiotique dans le lait, le retard d'acidification dans les moules devient de plus en plus important, pour aboutir finalement à une inhibition presque complète au cours du moulage et de l'égouttage, comme du caillage.

Ainsi apparaît la notion d'un seuil d'inhibition, à partir

duquel le retard d'acidification permet une pullulation suffisante des colibacilles, pour changer la texture même du caillé. Ces constatations font ressortir l'importance de la qualité biologique du lait : en effet, on comprend aisément maintenant comment un lait renfermant déjà un grand nombre de bactéries indésirables et plus ou moins antibio-résistantes, conduira en présence de concentrations même faibles d'antibiotiques, à des résultats beaucoup plus désastreux qu'un lait de bonne qualité bactériologique.

IV. Les concentrations critiques en antibiotiques dans le lait de fromagerie

On possède assez peu de renseignements sur les doses d'antibiotiques dont la présence dans le lait suffit à entraîner une dépréciation du fromage, en raison du coût élevé de telles expériences.

La réunion des résultats de plusieurs recherches menées de façon indépendante éclaire malgré tout cet aspect du problème. Souvent les doses critiques d'antibiotiques ne sont pas les mêmes d'un type de fromage à l'autre. Chaque type de fromage possède en effet sa flore particulière de micro-organismes responsables de la fermentation caractéristique de ce fromage. Les fromages à fermentation propionique, tels que l'Emmenthal, le Gruyère, le fromage Danois de type Suisse et le fromage de Herrgard, ne sont pas altérés pendant leur maturation par des quantités de pénicilline aussi faible que 0.005 U.I./ml, mais ils peuvent l'être à partir de 0.01 U.I./ml de lait. Cette haute sensibilité vient du rôle

actif joué dans la maturation de ces fromages par *L. bulgaricus* et *Str. thermophilus.*

Il semble que les fromages à pâte pressée du type Cheddar ne ressentent les effets de la pénicilline qu'à partir d'un niveau de 0,10 U.I./ml de lait. Les recherches poursuivies par WHITEHEAD et LANE viennent corroborer ce chiffre puisqu'elles indiquent 0.10 à 0.15 U.I./ml comme doses critiques. Pour le fromage de Cheshire, THOMAS, PANES et LEWIS ont situé les doses critiques entre 0,05 U.I. et 0,15 U.I./ml de lait.

Pour les fromages du type Tilsitt, le gonflement ne se produit, ainsi que l'a démontré SEELEMAN, qu'en présence de concentrations de l'ordre de 0.15 U.I./ml. On n'observe aucune altération de ces fromages pour des concentrations plus faibles.

En fromagerie de Camembert, des essais entrepris par J. JACQUET, J. DELACROIX et H. GONDOUIN [8] ont permis de constater que des teneurs de 150 à 200 U.I. de pénicilline par litre de lait, déclenchent des accidents de fabrication. Les mêmes auteurs ont montré que pour le Gruyère les accidents apparaissaient pour 20 U.O./l de lait, tandis que la fabrication devient impossible pour 50 U.O./l de lait. Pour l'Edam, ils estiment la dose inhibitrice à 50 U.O./l. D'après ces résultats, on peut calculer que le lait de vaches traitées doit être dilué 500 fois avec d'autres laits et même dans certains cas exceptionnels 5 000 fois, lors de la première traite, pour que la formation d'acide lactique dans le fromage demeure inchangée. Ces travaux permettent d'estimer que les seuils d'inhibition pour les ferments lactiques se situent à des teneurs de 0.02 à 0.2 U.O. de pénicilline

par ml de lait. Pratiquement, un lait devient dangereux quand il contient plus de 150 U.O./l. En moyenne, on peut dire qu'il suffit d'un animal traité dans un troupeau de 100 vaches pour amener une perturbation visible dans la fabrication du fromage. Lorsque 10 vaches sur 100 reçoivent un traitement aux antibiotiques, la fabrication est sérieusement compromise.

Pour éviter ces accidents et le préjudice important qui en découle, il faut d'abord être capable de dépister les laits suspects, ensuite de s'en préserver.

CHAPITRE III

RECHERCHE DES ANTIBIOTIQUES DANS LE LAIT

De nombreuses recherches ont été conduites en vue de mettre au point des méthodes de détection valables. On demande à celles-ci d'être exactes, sensibles, reproductibles, et en outre simples et rapides. La mise au point d'une méthode possédant toutes ces qualités est extraordinairement difficile et n'a pu jusqu'à présent être obtenue.

La grande activité des antibiotiques sur les microorganismes demande une méthode de détection particulièrement sensible. On sait par exemple qu'une méthode analytique est généralement considérée comme sensible lorsqu'elle permet de déceler une partie par million d'une substance que l'on veut doser. Mais la détection d'une dose de pénicilline capable d'altérer le fromage nécessite des méthodes assez sensibles pour mettre en évidence une partie dans 100 000 millions. C'est vraiment « chercher une aiguille dans une botte de foin ».

Le temps nécessaire à l'examen d'un échantillon ne devrait pas dépasser dix minutes. Il serait possible ainsi de tester le lait à son arrivée sur le quai de la laiterie avant d'en prendre livraison du producteur.

Il semble cependant bien improbable qu'une méthode aussi rapide puisse être mise au point dans un avenir immédiat. Actuellement, la plupart des tests de recherche des antibiotiques demandent, dans l'ensemble, deux à huit heures. La recherche des antibiotiques dans le lait s'effectue généralement par voie indirecte en mesurant soit la croissance des bactéries dans le lait, soit le produit du métabolisme de ces bactéries. Les critères habituellement reconnus sont: la croissance visible sur bouillon ou gélose; l'abaissement du pH et l'augmentation de l'acidité titrable: la vitesse de coagulation par la présure ou par acidification et les réactions colorées données par les indicateurs de pH et les indicateurs d'oxydo-réduction. Ces derniers comprennent le bleu de méthylène, la résazurine et le chlorure de tétrazolium. La comparaison avec les échantillons témoins ne contenant ni antibiotiques ni substance inhibitrice, permet de déterminer les propriétés du lait soumis à l'essai.

Compte tenu du fait que dans la pratique une méthode sera d'autant plus intéressante que la présence et l'activité de l'antibiotique sera plus rapidement déterminée, nous nous appesantirons plus spécialement sur le test d'activité des levains et le test reposant sur l'emploi des disques de papier. Auparavant nous examinerons différents procédés de titrage, souvent moins rapides certes, mais qui dans certaines circonstances conservent tout leur intérêt :

I. Méthode de G. Sanchez et A. Lamensans [24]

Ces auteurs ont proposé dès 1948 une méthode de recherche des antibiotiques dans les solutions, les émulsions et les pommades, qui permet de déceler dans le lait

l'apparition des premières unités de pénicilline et de streptomycine.

Le principe du dosage repose sur l'emploi d'un *Lactobacillus bulgaricus* test. Ce germe a la propriété de se multiplier dans le lait à 45°C avec une extrême rapidité, provoquant la coagulation du milieu en 2 h 30.

Le développement de ce bacille est inhibé d'une manière constante par de faibles concentrations de pénicilline, de streptomycine et de thyrothricine.

La sensibilité de ce procédé permet de déceler des quantités de l'ordre de 0,03 U.O. de pénicilline et de 0,1 U. Waksman de streptomycine. Cette méthode générale fut reprise au Danemark et utilisée selon le protocole suivant :

Une souche de *Lactobacillus*, sensible à la pénicilline en concentration de 0,01 U.I. par ml de lait, et coagulant le lait en environ deux heures et demie à 45°C, a été utilisée comme organisme du test. Les cultures furent conservées dans du lait écrémé autoclavé contenant de l'extrait de levure. On soumet alors au test des échantillons de lait de 2 ml, chauffés à 90°C en dix minutes puis refroidis à 45°C. On ajoute une goutte de culture à chacun et les tubes sont mis à l'étuve à 45°C jusqu'à ce que l'échantillon de contrôle soit coagulé (2 h 30 à 3 h). Une autre application du test est plus rapide, mais moins sensible : du lait écrémé stérile, plus de l'extrait de levure ensemencé avec 3 % de culture, est mélangé à chaque échantillon de lait dans la proportion de 2 à 1. On met ensuite à l'étuve à 45°C pendant 2 h 30 à 3 h. Les tubes restant encore liquides au bout de ce laps de temps sont soupçonnés de contenir des antibiotiques.

II. Méthode de M. Lemoigne, G. Sanchez et H. Girard [16]

Les auteurs utilisent des souches spéciales de ferments lactiques : *Streptococcus lactis* 1-5 très sensible à la pénicilline (dose inhibitrice: 0,1 U.O./ml, désigné par les lettres S.N.). Ensuite, par repiquages successifs dans du lait contenant des doses croissantes d'antibiotiques, on recherche l'obtention de souches résistantes :

— avec la pénicilline, 360 repiquages ont permis d'avoir une souche S.P. coagulant en douze heures à 30°C dans du lait contenant 5,5 U.O. par ml. Repiquée dans du lait pénicilliné, elle a perdu peu de sa résistance (coagule dans le même temps du lait contenant 3 U.O. par ml après 30 repiquages) ;

— la même souche S.N. a été entraînée à se développer sur du lait contenant de la streptomycine. L'accoutumance fut plus facile à obtenir et après 5 repiquages sur du lait contenant cet antibiotique, les auteurs possédent une souche S.S. coagulant en douze heures à 30°C du lait contenant 10 microgrammes de streptomycine par ml;

— enfin, la souche S.P. pénicillino-résistante a été entraînée à pousser sur du lait contenant de la streptomycine, ce qui conduit à l'obtention d'une souche S.P.S. résistante aux deux antibiotiques.

L'emploi de ces quatre souches entretenues au laboratoire permet de réaliser facilement l'analyse.

Technique

Dès son arrivée à l'usine, le lait est réparti à raison de 10 ml dans quatre tubes à essais qui sont ensemencés respectivement avec les souches S.N., S.P., S.S. et S.P.S. Les tubes sont maintenus à 30°C soit dans une étuve, soit plus simplement dans la salle d'emprésurage. On peut perfectionner l'essai en répartissant le lait dans des tubes stériles et chauffés pendant dix minutes à 80-90°C. Les tubes sont refroidis à 30°C et traités comme précédemment, mais les résultats obtenus sont plus nets.

Le lendemain, les cas suivants peuvent se présenter :

— coagulation du lait dans les quatre tubes, d'où l'on conclut à l'absence dans le lait d'antibiotiques ou d'antiseptiques à dose inhibitrice;

— coagulation dans les tubes ensemencés avec les souches S.P. et S.P.S., le lait contient de la pénicilline et rien que de la pénicilline à dose inhibitrice;

— coagulation dans les tubes ensemencés avec S.S. et S.P.S. Le lait contient de la streptomycine et rien que de la streptomycine à dose inhibitrice;

— coagulation dans le tube ensemencé avec la souche S.P.S., les deux antibiotiques (pénicilline et streptomycine) sont présents à doses inhibitrices;

— enfin, si la coagulation n'apparaît dans aucun tube, il faut penser à la présence soit d'un autre antibiotique, soit d'un antiseptique.

Dopter [2] a proposé par la suite une extension de cette méthode pour la recherche de divers autres antibiotiques, seuls ou associés, en particulier la pénicilline,

l'auréomycine et la streptomycine. Utilisant les souches déjà sélectionnées par LEMOIGNE, SANCHEZ et GIRARD, l'auteur a pu en obtenir de nouvelles, accoutumées aux trois antibiotiques seuls ou associés dans des proportions correspondant à celles que l'on rencontre généralement dans les produits les plus employés en thérapeutique vétérinaire, contre les mammites.

En voici les caractéristiques :

N. *S. lactis* non accoutumé;

A. *S. lactis* accoutumé à l'auréomycine;

P. *S. lactis* accoutumé à la pénicilline;

S. *S. lactis* accoutumé à la streptomycine;

P.A. *S. lactis* accoutumé à la pénicilline et auréomycine;

P.S. *S. lactis* accoutumé à la pénicilline et streptomycine;

A.S. *S. lactis* accoutumé à l'auréomycine et streptomycine;

P.A.S. *S. lactis* accoutumé à l'auréomycine, streptomycine et pénicilline.

Le lait à examiner est réparti aseptiquement dans huit tubes à essais stériles à raison de 10 ml/tube. Ceux-ci sont ensuite plongés pendant dix minutes dans un bain-marie chauffé à 90°C. Après refroidissement à 30°C environ, ils sont ensuite ensemencés respectivement avec 0,25 ml de chacune des huit souches fraîches ou n'ayant pas plus de trois jours de conservation à 4°C, puis sont mis en incubation à 30°C. Au bout de douze heures au maximum, on note s'il y a eu ou non coagulation, ce qui permet de répondre aux différents cas envisagés.

La coagulation peut n'être que partielle dans le cas où la quantité d'antibiotique existant dans le lait est très voisine du taux auquel la souche correspondante est accoutumée. Il convient néanmoins de considérer la recherche comme positive.

III. Méthode de Pien-Lignac et Claude [23]

Cette méthode, qui a le mérite d'être rationnellement conçue puisqu'elle comporte les trois temps de recherche de la présence du facteur inhibiteur, de détermination de ce facteur et de dosage du facteur inhibiteur, est malheureusement une épreuve de longue durée, ce qui réduit sa portée pratique dans le domaine qui nous préoccupe.

Premier temps : On procède à un chauffage initial de l'échantillon à examiner, destiné à détruire les facteurs inhibiteurs thermolabiles (bactériophages, antiseptiques). On recherche ensuite la présence des facteurs thermostables (essentiellement les antibiotiques) par ensemencement du lait avec une souche lactique et dosage de l'acidité produite. Il suffit alors de comparer cette acidité avec celle produite par un lait témoin dans les mêmes conditions.

Deuxième temps : Détermination de la nature de l'antibiotique présent dans le lait.

Pour cela, les auteurs ont déterminé pour un certain nombre de substances (antiseptiques et antibiotiques) le seuil de toxicité et la dose inhibitrice de ces substances vis-à-vis de la souche *Streptococcus lactis*. Ensuite, par

repiquages successifs dans des laits renfermant des concentrations de plus en plus élevées de la substance toxique, on parvient à habituer le ferment à travailler normalement, non seulement dans la zone de toxicité, mais aussi dans la zone des concentrations totalement inhibitrices.

En outre, les auteurs constatent que la résistance ainsi obtenue est spécifique.

Plusieurs échantillons du lait suspect sont ensemencés, chacun avec l'une des souches résistantes et soumis à l'incubation. Toutes les souches seront inhibées, sauf celle qui est entraînée à résister à l'antibiotique présent.

Troisième temps : On procède au dosage en ensemençant le lait suspect avec des souches entraînées à résister à des doses successives comprises entre le seuil de toxicité et la dose inhibitrice de la substance diagnostiquée.

Très polyvalent, ce procédé est limité uniquement par la possibilité d'obtenir des souches résistantes à telle ou telle substance. Ainsi, P. Dopter [2] signale l'impossibilité d'accoutumer cette souche de *Str. lactis* à la terramycine. Mais c'est une méthode très longue (les auteurs estiment un ou deux jours) et qui nécessite deux temps différents pour la recherche qualitative et le dosage. Pour pallier cet inconvénient, Jacquet et M^me^ Steeg préconisent alors la méthode de la double épreuve qui permet de pratiquer en même temps la recherche qualitative et la recherche quantitative.

IV. Méthode de J. Jacquet et de Mme L. Steeg [10]

Pour déterminer dans le lait la présence de la pénicilline, streptomycine, auréomycine, les auteurs utilisent la méthode suivante : le lait à tester est déposé dans une cupule pratiquée au centre de quatre boîtes de Pétri, renfermant chacune une gélose de Heatley en couche épaisse et ensemencée immédiatement auparavant avec quelques gouttes d'une culture en bouillon de l'un des germes ci-après : *Micrococcus pyogenes* (d'origine bovine) sensible aux trois antibiotiques, même souche mais additionnée de pénicillinase (Pénase) *Bacillus cereus* sensible à la streptomycine, *Bacillus mycoides* sensible à l'auréomycine mais résistant aux autres antibiotiques. Après 18 h d'étuve à 37°C on note les zones d'inhibition autour de la cupule. Les conclusions suivantes peuvent être tirées :

— absence de zone d'inhibition dans les boîtes ensemencées avec *M. pyogenes* plus Pénase et avec *B. mycoides* : présence de pénicilline ;

— absence d'inhibition dans la seule boîte ensemencée avec *B. mycoides* : présence de streptomycine ;

— existence d'une zone d'inhibition dans les quatre boîtes : présence d'auréomycine.

Cette technique permet de reconnaître la présence de deux ou trois antibiotiques associés. Après leur diagnostic, il est possible de les titrer en se servant de courbes d'étalonnage que les auteurs ont établies pour les trois souches microbiennes, donnant en ordonnées les diamètres des zones d'inhibition et en abscisses les concentra-

tions respectives de pénicilline pour *M. pyogenes*, de streptomycine pour *B. cereus* et d'auréomycine pour *B. mycoides*.

Toutefois, en raison des mutations possibles de ces germes, les auteurs recommandent de refaire de temps à autre l'étalonnage de leur inhibition vis-à-vis des antibiotiques. Enfin, ils signalent qu'aucune erreur n'est à craindre du fait de l'addition au lait d'antiseptiques: les taux de ces derniers pouvant éventuellement être utilisés sont insuffisants pour inhiber les cultures des germes choisis.

La méthode est également applicable aux caillés et fromages: elle pourrait d'ailleurs s'étendre à l'expertise d'autres denrées alimentaires et s'adapter à la recherche et au titrage d'autres antibiotiques, en disposant pour chacun d'eux d'une souche sensible et d'une souche spécifiquement résistante.

V. Méthode du test d'activité des levains

Abordons maintenant la méthode dite du test d'activité des levains, sûre et relativement précise depuis qu'elle a été mise au point par Horall et Elliker en 1950 [5]. Elle permet de découvrir les anomalies concernant la production d'acide lactique dans le lait par les micro-organismes des levains.

Le procédé n'est pas fixé d'une façon rigide et des modifications y sont souvent apportées. En règle générale, on ajoute 1 millilitre de levain actif à 10 millilitres du

lait soumis à l'essai. On ajoute la même quantité de levain à 10 millilitres de lait témoin. Un lait témoin est un lait dont on sait qu'il ne possède pas de propriétés antibiotiques ou inhibitrices. Les laits placés dans des tubes à essai sont incubés pendant quatre heures à 35°C. Au bout de ce temps d'incubation les quantités d'acide lactique produites dans les deux laits sont mesurées par titrage direct au moyen de soude diluée. L'exemple suivant montre sous quelle forme on doit interpréter les propriétés inhibitrices du lait à essayer, vis-à-vis des bactéries lactiques : en quatre heures l'augmentation de l'acidité titrable du lait témoin est de 0.50 % en NAOH N/20; l'augmentation du lait soumis à l'essai est également de 0.50 %. Ce lait est donc un lait normal puisqu'on peut le considérer comme ayant une activité semblable à celle du lait témoin (100 pour cent).

Un autre lait à essayer présente en quatre heures une augmentation se montant seulement à 0,10 % en NAOH N/20. Un tel lait comparé au lait témoin est considéré comme possédant une activité de 20 %. Ce lait est anormal et possède des propriétés inhibitrices pour les bactéries servant à la fabrication du fromage. Le plus souvent, on donne la préférence à la méthode de titration directe de l'acide lactique parce qu'elle a l'avantage d'être rapide. Plusieurs autres moyens présentent par contre l'avantage d'une plus grande simplicité et sont quelquefois employés. On peut se baser sur le temps nécessaire à la coagulation du lait; mais des facteurs autres que les substances inhibitrices peuvent influencer la coagulation, ce qui rend la fin de réaction difficile à définir. On peut aussi avoir recours, au lieu du titrage direct, à des indicateurs de pH comme le pourpre de

bromocrésol. Ce procédé donne dans bien des cas des résultats satisfaisants, bien que le virage ne soit pas toujours facile à saisir. L'épreuve d'activité des levains est d'une grande utilité dans la pratique industrielle, mais son application est limitée. En effet, cette épreuve n'est nullement spécifique de la présence des antibiotiques; par contre, elle est influencée par toutes les conditions du milieu ou par toutes les substances qui rendent le lait impropre à la croissance des bactéries lactiques. Elle peut donc indiquer également, outre la présence des antibiotiques, celle du bactériophage, des composés d'ammonium quaternaires, des inhibiteurs naturels existant dans le lait, et des microbes de contamination indésirables. Si la pénicilline est le seul agent inhibiteur présent, cette méthode, basée sur l'emploi des levains lactiques comme organismes-test, sera capable de détecter 0.1 U.I./ml de lait.

De quatre à six heures sont nécessaires pour que les résultats soient bien nets. La méthode est très empirique et demande que l'on suive avec une très grande exactitude les quantités, le temps et les températures recommandé.. Le choix d'un lait témoin convenable est un facteur important. Il est nécessaire d'employer un lait frais venant d'un troupeau non traité par les antibiotiques, et possédant les qualités requises pour une bonne production d'acide lactique. On peut souvent obtenir un lait témoin satisfaisant en partant d'un lait en poudre de bonne qualité reconstitué à raison de 10 grammes de poudre pour 100 millilitres de liquide final.

Modification du test d'activité

De nombreuses améliorations ont été proposées pour

le test d'activité des levains. On a préconisé l'emploi de levains plus sensibles que les levains lactiques habituels afin d'augmenter la sensibilité de la méthode et de réduire la durée de l'opération. Deux bactéries ont été essayées séparément avec succès : *L. bulgaricus* et *Str. thermophilus* (Ulberg, 1952; Berridge, 1953; Hietaranta et Timroth, 1953) : ces bactéries sont utilisées dans une autre méthode (Neal et Calbert [19]) basée sur l'emploi du chlorure de tétrazolium comme colorant. La modification ainsi proposée permet d'atteindre un degré de sensibilité de 0.01 à 0,04 U.I./ml. Si cette méthode est employée spécialement pour la recherche de la pénicilline, un tube du lait à essayer est additionné de pénicillinase. Le temps d'incubation proprement dit est ainsi ramené dans certains cas à moins d'une heure, mais le temps nécessaire pour l'ensemble de l'épreuve est sans doute supérieur à cette durée. L'identification d'un antibiotique ou d'un antiseptique introduit dans le lait est possible (Pien, Lignac et Claude) [23] grâce à l'utilisation de souches de *Str. lactis* résistantes à un antibiotique ou à un antiseptique déterminé. Une souche résistante à la pénicilline, par exemple, se développera en donnant une croissance anormale. Ainsi l'identification d'un antibiotique présent dans le lait peut se faire grâce à l'action qu'il produit sur ces bactéries lactiques spécialement entraînées.

VI. Méthode des disques de papier

D'abord mis au point dans les laboratoires médicaux, le disque de papier fut appliqué au lait avec succès et sans modification appréciable par les Laboratoires Difco.

aux Etats-Unis. La méthode est basée sur le principe suivant: lorsqu'un antibiotique est placé à la surface de la gélose au contact de micro-organismes sensibles qui viennent d'être ensemencés sur ce milieu, il empêche leur croissance. Le matériel est constitué par des disques de papier de 9 à 12 mm, une suspension de spores de Subtilis, un milieu au Whey-Agar.

Pour préparer le milieu, dissoudre 10 g de Whey-Agar dans un peu d'eau distillée froide : agiter ou désagréger les grumeaux. Compléter à un litre. Porter à ébullition à l'autoclave ou dans un bain-marie pour dissoudre la gélose. Répartir en tubes: mesurer exactement 12 ml si le milieu est destiné à faire des titrages. Stériliser à l'autoclave quinze minutes à 120°C.

Les cultures seront obtenues ainsi : faire fondre le milieu gélosé, puis le ramener à 50°C. Ajouter dans chaque tube 6 gouttes de la suspension de spores. Couler le milieu en boîtes de Pétri standard. Conserver les boîtes ensemencées à la glacière (un mois au maximum).

Pour rechercher la pénicilline dans un échantillon de lait, on emploie alors la technique suivante :

chauffer quelques ml de lait à examiner à 82°C pendant cinq minutes. Refroidir à 33°C pour examen immédiat ou à 4°C si l'examen doit avoir lieu ultérieurement:

imprégner le disque de lait en mettant en contact le bord du disque avec la surface du liquide jusqu'à saturation par capillarité. Le disque posé sur la gélose ne doit pas être entouré d'un anneau liquide. On peut aussi immerger franchement le disque dans le lait et l'essorer en le passant sur un papier filtre stérile;

— le disque est posé, puis légèrement collé à la gélose par une faible pression du bout de la pince. On peut mettre de 8 à 12 disques par boîte selon le diamètre. La boîte de Pétri est ensuite retournée et placée à l'étuve à 37°C pendant quatre à six heures;

— le diamètre de la zone d'inhibition est proportionnel à la concentration de la pénicilline dans le lait. On peut établir une courbe étalon en plaçant sur la gélose des disques contenant des concentrations connues de l'antibiotique. Le diagnostic de la pénicilline se fait en plaçant sur la boîte un disque imprégné de lait contenant de la pénicillinase.

A la fin de la période d'incubation la présence de pénicilline est indiquée par une zone claire tout autour du disque. L'absence d'antibiotiques se traduit par une croissance uniforme sur toute la surface de la boîte sans zone d'inhibition. Le diamètre de la zone dépend de la concentration de l'antibiotique et de la diffusion de ce dernier dans la gélose au lactosérum. On peut ainsi estimer la concentration de l'antibiotique d'après la taille de la zone claire.

B. subtilis n'est pas le seul organisme capable de donner de bons résultats dans ce test. *Staph. aureus* et *Sarcina lutea* sont aussi employés avec succès. *B. subtilis* est le plus fréquemment utilisé parce qu'il peut être ajouté sous forme d'une suspension de spores et ainsi ne demande pas de repiquage préalable. *Str. lactis* est également sensible aux antibiotiques, mais moins bien adapté à ce test parce qu'il ne se développe pas aussi rapidement et aussi largement sur la gélose au lactosérum. Le test par disques de papier est d'un intérêt capital et a déjà fait

ses preuves. Il est plus spécifique et plus sensible que le test d'activité des levains. En fait, ces deux tests se complètent mutuellement. La pénicilline est l'antibiotique le plus facilement détecté par le test reposant sur l'emploi des disques en papier. Le disque peut détecter 0,1 U.I. de pénicilline par millilitre de lait et de une à deux unités d'auréomycine ou de streptomycine. On peut augmenter la sensibilité en utilisant des disques de plus large diamètre, en réduisant le volume du milieu, en plaçant à la glacière quinze à trente minutes avant d'incuber à 37°C.

Une autre modification de la méthode, consistant à employer la dessication du lait sous vide et à remplacer le disque en papier par des comprimés obtenus avec le lait sec ainsi préparé, a permis de décupler la sensibilité de sorte que l'on peut détecter maintenant 0,01 U.I. de pénicilline par millilitre de lait (Kosikowski et Mocquot, 1956) [15]. Il est aussi possible de rechercher la pénicilline ou d'autres antibiotiques directement dans le fromage, en utilisant un cylindre (diamètre : 1 cm environ, hauteur : 0,2 cm), coupé sur une sonde de fromage (Mocquot et Lefebvre, 1956).

***

Sensibilité de la méthode des disques pour le dosage de pénicilline dans le lait

QUANTITÉ DE PÉNICILLINE AJOUTÉE AU LAIT	DIAMÈTRE DES ZONES D'INHIBITION	
	Disques en papier	Comprimés de lait secs
γ/ml	En centimètres	
0,00	Pas de zone	Pas de zone
0,01	»	1,0
0,02	»	1,1
0,03	»	1,2
0,05	»	1,4
0,10	1,6	1,9

Diamètre du disque en papier : *1,3 cm.*

Diamètre du comprimé de lait sec : *0,9 cm.*

(D'après F. V. Kosikowski et G. Mocquot, 1955.)

Différents facteurs peuvent intervenir pour modifier les résultats. Ce sont: l'épaisseur de la couche de gélose, la concentration des spores de *B. subtilis* et le diamètre des disques de papier. Dix millilitres de gélose au lactosérum dans une boîte de Pétri normale, 1 millilitre de suspension de spores pour 100 millilitres de gélose, des disques de 12 millimètres de diamètre donnent des zones de taille optimum.

Lorsque du lait cru est soumis à l'essai, on obtient des petites zones d'inhibition même en l'absence de pénicilline. Le chauffage systématique de tous les laits à examiner, pendant cinq minutes à 80°C avant de les soumettre à l'épreuve, élimine ces zones de fausse inhibition et n'altère pas de façon appréciable l'antibio-

tique éventuellement présent. Ces méthodes d'essai destinées à la détection des antibiotiques paraissent compliquées, mais sont en réalité simples dans le principe et dans l'application. Dans certains cas, les laboratoires qui veulent disposer de tout le nécessaire peuvent se procurer un coffret contenant un équipement complet permettant d'effectuer le test par disques de papier. La durée de l'incubation, quatre à sept heures, présente un certain inconvénient, mais ne constitue pas un obstacle majeur au contrôle des échantillons de lait, puisqu'il n'existe pas de test rapide présentant des garanties solides.

CHAPITRE IV

COMMENT SE DÉFENDRE CONTRE LES LAITS A ANTIBIOTIQUES

Il est difficile de tracer un programme efficace de lutte contre la présence des antibiotiques dans le lait. Les moyens ordinaires pour annuler l'effet des antibiotiques ne peuvent s'appliquer pendant les opérations de transformation du lait.

La pasteurisation n'a que peu d'action sur les antibiotiques. L'addition de fortes quantités de levain ne permet pas de surmonter l'effet des antibiotiques même à de faibles concentrations et une telle addition serait d'ailleurs irréalisable en pratique.

Tenant compte de ces difficultés, deux principaux moyens sont à envisager :

a) limiter ou neutraliser les effets des antibiotiques par des procédés scientifiques;

b) se défendre de ces mêmes effets par une éducation bien comprise du producteur et par des règlements appropriés.

Les procédés qui du point de vue scientifique paraissent les plus avantageux sont l'emploi de souches résistantes et l'emploi d'un enzyme: la pénicillinase capable d'inactiver la pénicilline.

I. Souches de levain résistantes

On peut obtenir des souches de levain résistantes aux antibiotiques en les faisant se développer dans du lait contenant des concentrations croissantes de l'antibiotique. De nombreux essais de cette nature ont été couronnés de succès. Des chercheurs canadiens (Katznelson et Hood) [14] augmentèrent la résistance à la pénicilline, de bactéries provenant d'un levain lactique, de 0,1 à 3,0 U.I. par millilitre. Cette résistance était conservée après 20 repiquages dans du lait ne contenant pas de pénicilline. Au Danemark, Jepsen et Overby [12] ont obtenu par le même procédé une souche de levain capable de résister à 1,0 U.I. par millilitre. Ces premiers levains résistants perdaient leur faculté de produire leur arôme caractéristique, mais les essais ultérieurs ont permis d'obtenir des levains conservant cette propriété.

On trouve quelquefois des souches de streptocoques lactiques qui sont naturellement résistantes, mais de telles souches sont peu nombreuses. Les *Str. fæcalis* sont particulièrement résistants à la pénicilline aux concentrations où on la rencontre habituellement dans le lait. Ils peuvent donc être utilisés avec succès pour certains fromages. Storgards [25] a utilisé une souche particulièrement résistante de *Str. fæcalis* pour la fabrication du fromage d'Emmenthal. Mais les bactéries appartenant

à cette espèce, sauf si elles sont spécialement sélectionnées, ne sont que des producteurs très médiocres d'acide lactique. Il est donc bien improbable que cette seule culture puisse être employée avec succès dans les divers procédés de fabrication du fromage. On ne se procure que difficilement dans le commerce, si même on en trouve, ces souches résistantes. Les raisons de cet état de choses sont probablement multiples : le temps nécessaire à l'application pratique des techniques d'obtention des souches résistantes a manqué ; le coût de la préparation et les difficultés possibles pour la mener à bien dans les conditions de la pratique ont constitué un sérieux obstacle.

II. Pénicillinase

La destruction de la pénicilline dans le lait est également possible grâce à l'action d'un enzyme découvert en 1940 par Abraham et Chain : la pénicillinase.

Certaines espèces de bactéries, en effet, particulièrement *E. coli* et *B. subtilis*, contiennent une diastase capable d'inactiver spécifiquement la pénicilline.

La préparation industrielle de la pénicillinase s'effectue maintenant à partir d'organismes microbiens, notamment *B. cereus*. Il est facile de s'en procurer, mais son prix demeure relativement élevé. Ajoutée à du lait contenant de la pénicilline, elle détruit celle-ci et permet à ce lait de se laisser traiter en fromagerie comme des laits normaux. La pénicillinase est une substance non toxique qui n'apporte ni goût, ni odeur et ne modifie en rien l'aspect des fromages. Elle se conserve au moins un an à une température inférieure à + 5°C. A température

ordinaire, 20°C, on peut compter sur six mois de conservation. Son emploi n'est nullement contraire à la réglementation en vigueur; aucune objection ne peut être faite quant à son incorporation, systématique ou non dans le lait. La pasteurisation ne la modifie guère, mais son efficacité peut en revanche être influencée par des facteurs tels que la concentration, la durée de la réaction ou la température.

1. *Concentration*

Les recherches poursuivies en Suède et au Danemark indiquent les quantités de pénicillinase nécessaires à l'inactivation de la pénicilline. Des courbes ont été construites à partir des données obtenues en ensemençant à 30°C, le lait contaminé par la pénicilline avec le levain, aussitôt après l'addition de pénicillinase. On évaluait la quantité d'acide formée pour plusieurs concentrations de pénicillinase, en mesurant l'acidité titrable ou le pH. Pour une même dose de pénicilline, les résultats des deux stations de recherches, danoise et suédoise, ne concordent pas, mais ceci est attribué à l'emploi de procédés de mesures différents ou de pénicillinase de fabrication différente. Les deux études montrent que plus la quantité de pénicilline dans le lait est faible, plus la quantité de pénicillinase nécessaire pour inactiver une unité de pénicilline est proportionnellement forte. Pour les concentrations de pénicilline habituellement rencontrées dans le lait (0,5 U.I. ml) la quantité de pénicillinase suffisante pour en détruire les effets est de 1.3 (Hillerod) ou 4.0 U.I./ml (Alnarp).

2. *Influence de la durée d'action et de la température*

La durée d'action et la température sont des facteurs importants lorsqu'il s'agit de déterminer les doses de pénicillinase nécessaires à l'inactivation d'une unité de pénicilline. Plus la période d'incubation est courte et la température basse, plus la quantité de pénicillinase nécessaire est forte. Comme nous le verrons tout à l'heure, ces facteurs ont leur importance pour l'application pratique du procédé.

On a réussi à fabriquer en Suède un fromage de Herrgard normal en partant de lait contaminé par la pénicilline dans lequel la pénicillinase avait été ajoutée au lait cru de mélange frais sans incubation préalable. La dose employée était de 2 unités de pénicillinase pour 1 U.I. de pénicilline. Au Danemark, on a obtenu également un fromage normal à partir de lait contenant de la pénicillinase. Celle-ci était ajoutée directement au lait pasteurisé porté à 30°C, dans les cuves à fromage, avec une durée d'incubation de trente minutes. Le rapport de pénicillinase/pénicilline devenait alors 0,5 unité de pénicillinase pour 1 U.I. de pénicilline par millilitre de lait. En France, quelques fromageries ont tenté l'utilisation de la pénicillinase, commercialisée sous le nom de Pénase. Tenant compte des modalités d'action exposées plus haut, les conditions d'emploi pratique comportaient généralement les étapes suivantes, selon que le traitement du lait se faisait à la ferme ou à l'usine :

3 *Traitement à la ferme*

C'est la solution préférable, car la pénicillinase agit d'autant mieux qu'elle reste plus longtemps en contact

avec la pénicilline et surtout parce que le lait, milieu vivant, retrouve rapidement son équilibre biologique normal. Cette solution est malheureusement difficile à généraliser, mais elle sera à conseiller toutes les fois que cela sera possible. En estimant à 10 à 15 000 U.I. litre les teneurs maxima que l'on peut trouver dans le lait d'une vache traitée, il faut recommander la dose d'emploi d'un comprimé par seau (soit 50 000 U. de pénicillinase pour 10 à 15 litres).

4. *Traitement à l'usine*

Il suffit pratiquement que 1 100 du lait provienne de vaches traitées contre la mammite pour que l'on commence à observer des accidents. Si cette proportion atteint 1 10, les accidents sont très sérieux et la fabrication du fromage devient impossible, mais c'est là un cas rare et l'on se trouve, en général, placé entre ces deux limites.

Finalement, la quantité de pénicilline contenue dans les laits de grand mélange, tels qu'ils arrivent à l'usine, ne dépasse presque jamais 500 U.I. litre.

A la suite des essais effectués ces dernières années, il semble que le traitement de sécurité consisterait à traiter systématiquement les laits mélangés, dès leur arrivée à l'usine, à la dose de 1 comprimé (50 000 U.) par 100 litres. Les comprimés doivent être dissous (8 minutes environ) dans un peu d'eau, puis mélangés à la quantité de lait à traiter que l'on agitera ensuite.

L'activité optimum de la pénicillinase se situe vers 40 C.

A l'usine, si le lait est ensemencé le matin même de

son arrivée, il convient de le traiter dès l'arrivée et de laisser agir au moins une heure avant tout ensemencement par ferments lactiques. Le lait reçu le soir sera également traité dès son arrivée.

Il peut être commode, à l'usine, de préparer à l'avance une solution de pénicillinase, que l'on utilisera au fur et à mesure des arrivées de lait. Afin de préparer une telle solution titrée, il conviendra de faire dissoudre un nombre connu de comprimés de pénicillinase dans un volume connu d'eau distillée; la solution ainsi préparée et conservée à une température inférieure à + 5°C peut être utilisée pendant trois ou quatre jours.

Par leurs travaux publiés en 1951, JACQUET, DELACROIX et GONDOUIN [8] ont montré la voie et prouvé que l'emploi de la Pénase était industriellement possible dans une fabrication de camemberts et empêchait l'apparition des accidents provoqués par la présence des laits à pénicilline. Leurs conclusions très favorables, indiquent que la pénicillinase ne modifie en rien l'aspect des camemberts; elle favorise toujours le développement de l'acidification lactique au cours du moulage et de l'égouttage et n'agit que faiblement sur l'acidification, qui doit se faire pendant l'emprésurage et qui reste bloquée par la pénicilline. S'il y a suffisamment de pénicillinase, l'acidification se fera ensuite assez vite pour que les fromages paraissent absolument normaux. Les auteurs notent simplement que l'activité de la pénicillinase est inférieure à celle observée au laboratoire où 0,6 ml/litre de lait prévient l'accident provoqué par 150 U.O. de pénicilline; c'est donc à l'usine que devront être recherchées les doses utiles, qui, en outre, peuvent varier avec les différents types de fabrication.

Toutefois, il faut bien admettre que l'emploi de la pénicillinase, malgré son efficacité et les arguments donnés en sa faveur, ne s'est pas généralisé en raison de son prix élevé. En outre, de nombreux pays interdisent son usage en considérant que l'introduction du produit dans le lait constitue une falsification.

Ainsi l'industrie fromagère dispose d'un certain nombre de parades contre les laits contaminés. Cependant ces mesures auxquelles sont obligées de recourir les laiteries pour fabriquer convenablement avec des laits douteux (emploi de Pénase, de ferments spéciaux, comme d'ailleurs les procédés de désacidification, de désodorisation, de pasteurisation...), ne sont que des mesures négatives et qui grèvent lourdement le prix des produits fabriqués.

Le véritable problème est à la ferme : il faut éviter les causes plutôt que de traiter les effets.

Devant l'insuffisance des mesures de protection applicables à l'usine, il faut intervenir avant le ramassage, rechercher l'élimination des laits impropres aux fabrications industrielles, dès leur apparition dans le circuit commercial, c'est-à-dire au stade de la production. En l'absence de textes légaux, ces mesures exigent une collaboration beaucoup plus étroite entre producteurs et transformateurs, qui doivent se rendre compte que pour l'exploitation de cette richesse commune, le lait, ils sont intimement liés.

Deux solutions simples et facilement applicables ont déjà donné des résultats certains.

III. Réserver le lait aux usages de la ferme

Le moyen le plus simple de venir à bout du problème des antibiotiques serait évidemment de conserver tout le lait contaminé à la ferme. Suivant le type de préparation antibiotique utilisé, le lait des trois traites ou des six traites postérieures à la dernière injection d'antibiotique devrait être ainsi mis de côté. De nombreux pays ont interdit l'introduction du lait renfermant des antibiotiques dans les circuits normaux d'utilisation.

En Suisse, par exemple, le « Règlement concernant la production du lait » exige d'une manière impérative que le lait provenant de vaches traitées ne soit pas livré aux laiteries.

Aux Etats-Unis, le département de la Santé publique a pris comme règle de considérer la présence des antibiotiques dans le lait comme une falsification et propose que l'avertissement suivant soit placé sur les produits antibiotiques destinés à être introduits dans la mamelle : « Avis important » — le lait provenant de mamelles traitées devra être écarté ou employé autrement que pour la consommation pendant 72 heures au moins après le dernier traitement —. D'autres pays ont encouragé l'établissement de mesures de contrôle sans pour autant se montrer aussi stricts.

En Suède, le lait peut être distribué, à moins qu'il ne soit devenu nocif pour le consommateur du fait de l'emploi des antibiotiques. Dans l'ensemble, ces méthodes ont été difficilement acceptées par le fermier, car elles provoquent un surplus de lait à la ferme. De plus, il n'existe aucun test assez rapide permettant de faire la

preuve que le fermier se plie ou non aux règlements en vigueur.

Pour remédier à ces difficultés, on a tenté d'introduire des colorants inoffensifs dans l'antibiotique de façon que sa présence dans le lait puisse être décelée pendant trois traites au moins. Mais pour que le procédé apporte des résultats certains, il faudrait que toutes les préparations antibiotiques soient colorées. Il n'est donc pas surprenant que les règlements demandant de garder à la ferme le lait des vaches traitées n'aient guère été observés.

IV. Ségrégation du lait avant le ramassage

Une autre méthode consiste à demander au fermier de mettre à part le lait provenant des vaches traitées, d'en informer la laiterie et d'étiqueter les bidons avant le ramassage. Cette notification préalable permet à la laiterie d'orienter le lait vers la fabrication de produits pour lesquels la présence des antibiotiques n'est pas gênante.

Un tel système né d'un accord passé entre l'Association Suédoise des laiteries et le Ministère de l'Agriculture [27] donne de bons résultats en Suède depuis une dizaine d'années. Du protocole d'application il ressort que le vétérinaire ayant traité à la pénicilline ou d'autres antibiotiques des vaches malades doit en aviser la laiterie à laquelle le propriétaire des animaux traités livre son lait. Il donne en même temps à ce propriétaire une feuille de déclaration pour qu'il l'envoie à la laiterie avec son lait.

Les instructions données aux laiteries indiquent que le lait provenant de fournisseurs où a eu lieu un traitement aux antibiotiques, ne doit pas servir à la préparation de produits laitiers, et surtout pas à celle du fromage avant au plus tôt 72 heures après le dernier traitement. Ledit lait doit être soumis à l'épreuve de l'acidification pendant au moins 18 heures, les résultats seront indiqués sur la feuille jaune remise par le vétérinaire au fournisseur. Cette feuille sera envoyée par ce dernier à la laiterie avec le premier pot de lait livré après les 72 heures.

Le laitier doit rassembler les feuilles provenant du vétérinaire et du fournisseur et rendre compte des irrégularités. Les feuilles jaunes doivent être bien conservées et livrées chaque mois à l'Association Suédoise des laiteries.

Au Danemark, le même système encore plus draconien est renforcé par l'application d'amendes aux contrevenants. Le règlement précise que non seulement il est interdit de livrer du lait contenant des antibiotiques, mais aussi de livrer du lait auquel a été ajouté un produit détruisant les antibiotiques, comme par exemple la pénicillinase. Il est interdit d'ajouter de tels produits au lait et à la crème destinés à la fabrication du beurre, du fromage et des autres produits laitiers destinés à être exportés.

Il est interdit aux vétérinaires de fournir aux propriétaires de troupeaux des antibiotiques ou des ordonnances, sous une forme telle que ces préparations puissent être introduites dans la mamelle des vaches.

Lors de chaque traitement, le vétérinaire doit remettre,

au propriétaire du troupeau ou à son représentant, un imprimé indiquant la manière de s'en servir, les aviser des mesures prises et qui sont résumées ici, et leur préciser en même temps pendant combien de temps le lait des vaches traitées doit être laissé à la ferme. Le vétérinaire doit en outre munir les bidons de transport de lait du troupeau traité, d'une marque spéciale indiquant le traitement effectué et en même temps aviser les laiteries recevant le lait des troupeaux traités aux antibiotiques. Ces documents (imprimés et marques) doivent être fournis par les laiteries aux vétérinaires.

Toute violation de ces mesures entraîne des amendes de 20 à 20 000 couronnes danoises.

En France, la méthode rencontre de nombreuses difficultés dans son application, la négligence ou l'incompréhension des producteurs ayant fait longtemps obstacle à son bon rendement. Cependant, elle permet maintenant dans certaines régions, d'obtenir des laits de grand mélange peu ou pas contaminés, autorisant les fabrications habituelles sans accidents.

En attendant que les recherches de laboratoires apportent une solution pratique, il est bon de soutenir des méthodes de ce genre : elles ont le mérite de la logique et d'une simplicité relative.

Il faut les encourager partout où les laiteries peuvent recevoir du lait contaminé par les antibiotiques.

CONCLUSIONS

A techniques nouvelles problèmes nouveaux. La thérapeutique moderne des mammites n'a pas échappé à la règle. En dépit des recherches dont nous avons fait état et malgré les résultats obtenus, le problème de la protection des fabrications fromagères contre les laits antibiotiques reste posé : méthodes de recherche des antibiotiques trop longues et assez peu pratiques à mettre en œuvre, difficultés d'emploi d'un lait contaminé dont l'épuration systématique est encore onéreuse. Dans l'état actuel de la question, la solution ne peut être une : elle devra s'attaquer aux facteurs multiples qui conditionnent l'apparition sur le marché de laits contaminés.

En premier lieu et bien qu'on ne puisse en attendre de résultats immédiats, il serait nécessaire de mettre sur pied dès maintenant une prophylaxie des mammites, qui sont, personne ne le conteste, parmi les affections les plus graves sévissant dans le cheptel français. Il est inutile de s'appesantir sur les pertes économiques considérables qui en résultent, mais il est bon de préciser une nouvelle fois combien sont fréquentes les mammites chroniques, inapparentes et très généralement méconnues. Les méthodes de détection existent et l'éradication pourrait être très rapidement mise en œuvre. Sous l'égide de certaines organisations privées, semblable tâche a déjà été

entreprise et menée à bien : seuls des impératifs économiques retardent la mise en application à l'échelon national d'un tel programme d'assainissement.

Devant l'impossibilté de ramener actuellement le nombre d'animaux mammiteux à un taux compatible avec des fabrications laitières normales, il conviendrait alors que les producteurs prennent conscience de la nécessité de ne livrer à la consommation que des laits sains, indemnes de germes et de substances nocifs. Tel cultivateur, qui conçoit parfaitement qu'on ne livre pas au commerce de la viande insalubre provenant d'animaux malades — soumis qu'il est depuis des années à une réglementation sévère — mélangera, après tamisage, le lait provenant d'une vache à mammite avec le produit de la traite générale.

Ignorance ou cupidité ? Peu importe, l'une et l'autre plaident en faveur d'une réglementation sanitaire concernant la production et la vente du lait et des produits laitiers. Problème délicat, car mettant en jeu des intérêts divergents : les utilisateurs réclament cette réglementation depuis longtemps, mais les producteurs assaillis depuis quelques années par d'innombrables décrets, lois et circulaires sont opposés d'instinct à toute contrainte nouvelle. On pourrait tout au moins essayer d'utiliser les ressources d'un décret déjà ancien (22 janvier 1919) et libellé comme suit : « Est considérée comme une falsification aux termes de l'article 3 de la loi du 1er août 1905, l'addition au lait d'une substance quelconque, exception faite pour celles dont l'emploi pourrait être autorisé, en vue de la conservation du lait, par arrêté pris de concert par les Ministres de l'Hygiène et de

l'Agriculture, après avis du Conseil Supérieur d'Hygiène publique de France. »

Par ailleurs, il est évident que le colportage et la vente de plus en plus active de médicaments destinés au traitement des mammites, leur emploi massif par des utilisateurs peu avertis des inconvénients d'une telle médication appliquée sans discernement, ne font que compliquer le problème. Il paraîtrait logique si l'on veut obtenir des laits sains, d'en éviter le plus possible la pollution. Pour cela, il importe, dans le cas qui nous préoccupe, que la mise en œuvre d'un traitement aux antibiotiques relève de la décision d'un technicien compétent, connaissant à la fois les avantages et les inconvénients d'une telle thérapeutique, et capable d'en tirer le maximum de résultats avec un minimum d'ennuis. Qui, mieux que le vétérinaire, peut prétendre jouer ce rôle ? Tout projet de réglementation devra tenir compte de ce fait et prévoir d'importantes restrictions à la distribution anarchique des antibiotiques intramammaires.

Au terme de cette brève étude, nous espérons avoir fait ressortir les aspects importants de cette contamination de plus en plus fréquente des laits industriels par les antibiotiques. Les pertes économiques en résultant sont loin d'être négligeables ainsi que nous avons pu nous en assurer auprès de divers fabricants. La consommation répétée de tels laits peut amener la sélection d'une flore intestinale perturbée et antibio-résistante : l'Hygiène Publique aurait tout lieu de s'en préoccuper.

Pourtant on ne saurait charger les antibiotiques de tous les péchés : on a enregistré de tous temps des accidents de fabrication et ceci bien avant l'apparition de la pénicilline. Il convient donc d'être objectif et de

ne pas négliger l'activité du bactériophage, de la contamination par *E. coli* ou de l'activité de diverses substances inhibitrices, la nisine en particulier.

En outre, des travaux récents, notamment une étude publiée par JACQUET et ses collaborateurs [9], tend à ramener la culpabilité des antibiotiques dans des limites beaucoup plus acceptables.

Les auteurs, en effet, ont noté une modification très nette des ferments lactiques naturels du lait. Les troubles provoqués par des concentrations inférieures à 500 U. au litre sont faibles et autorisent des fabrications pratiquement normales. Les antibiotiques ne font plus que retarder le départ d'une fermentation lactique normale. Les levains lactiques, après avoir vaincu la gêne qui leur est opposée, manifesteraient même une activité plus grande par la suite, à tel point qu'on a pu émettre l'hypothèse que certaines souches lactiques, une fois l'inhibition surmontée, utiliseraient la pénicilline comme facteur de croissance, notamment en produisant une pénicillinase.

Dans ces conditions, on peut penser qu'une utilisation prudente et raisonnée des antibiotiques intramammaires, jointe à l'interdiction de livrer avant un certain délai du lait provenant de vaches traitées, seraient des mesures propres à résoudre le problème.

Pour ce faire, et dans le but de placer les différends pouvant naître entre producteurs et utilisateurs, sur des bases légales solides, nous proposons une réglementation basée sur les principes suivants :

a) La vente et la délivrance aux propriétaires de troupeaux, d'antibiotiques sous une forme telle que ces

préparations puissent être introduites dans la mamelle des animaux producteurs de lait, sont subordonnées à la présentation d'une ordonnance établie par un vétérinaire.

b) Lors du traitement aux antibiotiques d'une affection mammaire quelconque, la vente du lait ne pourra se faire que 72 heures au plus tôt après le dernier traitement.

c) Si le lait est vendu à un ramasseur, le lait des vaches traitées sera mis à part dans des bidons marqués.

d) Sera considérée comme fraude la présence dans un lait commercial d'une teneur en antibiotiques qu'il appartiendra au Service de la Répression des Fraudes de déterminer.

Il semble que les chiffres moyens suivants pourraient être adoptés : 200 U.I./l de pénicilline, 200 µg/l d'auréomycine, 100 µg/l de terramycine, 200 µg/l de chloromycétine et 400 µg/l de streptomycine.

Ces dispositions, malgré leur imperfection, auraient l'avantage de soumettre notre production à un contrôle comparable à celui en vigueur dans les pays connus pour la qualité de leurs produits laitiers, et contribueraient sans doute, toutes proportions gardées, à faire justice de la réputation d'insalubrité du lait français.

Vu : *Le Professeur de l'Ecole Vétérinaire,*
Rapporteur,
GODFRAIN.

Vu : *Le Directeur de l'Ecole Vétérinaire,*
P. PONS.

Vu : *Le Président de la Thèse,*
ANDRIEU.

Vu : *Le Doyen,*
LAZORTHES.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :
Toulouse, le 12 mai 1961.

Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université,
DOTTIN.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Auclair (J.). — Action inhibitrice de la pénicilline sur les lactobacilles utilisés dans la fabrication du gruyère. *Le Lait*, 1951, 31, 121-129.

[2] Dopter (P.). — La recherche d'antibiotiques seuls ou associés dans le lait. *C. R. Acad. Agric.*, 1956, 42, 519.

[3] Hietaranta (M.) et Timroth (I.) (von). — La durée de la résistance à la pénicilline chez les bactéries lactiques. *Meijerit. Aikakausk.*, 1954, 15, 58-68.

[4] Hietaranta (M.) et Timroth (I.) (von). — Méthode pour déceler la présence de pénicilline dans le lait. *Mejeritedskr. Finl. Svensk.*, 1953, 15, 61.

[5] Horall (B. E.) et Elliker (P. R.). — An activity test for Cheddar and Cottage cheese starters. *J. Dairy. Sci.*, 1950, 33, 245-249.

[6] Hovmand (H. C.), Jepsen (A.) et Overby (A. J.). — Two years of collective mastitis campaign in cooperative dairies with practical control of Penicillin-induced starter failures by use of Penicillin-resistant starter. *Nordisk Veterinaer Medicin*, 1954, 6, 591-621.

[7] Jacquet (J.). — La présence d'antibiotiques dans le lait et ses conséquences pour l'industrie laitière. *Comptes rendus XIII^e Congrès international de Laiterie*, 1953, 3, 1143.

[8] Jacquet (J.), Delacroix (J.) et Gondouin (H.). — Etude sur les accidents provoqués en fromagerie de Camembert par la présence de pénicilline dans le lait. *Bull. Soc. Vét. Prat.*, 1951, 35, 138.

[9] Jacquet (J.), Delacroix (J.), Letourneur (G.), Villette (O.). — Mise au point sur la sensibilité actuelle des ferments lactiques à la pénicilline en fromagerie de pâtes molles. *C. R. Acad. Agric. de France*, 1959, 45, 849-851.

[10] Jacquet (J.) et Steeg (L.). — Détermination et titrage des antibiotiques présents dans le lait et les produits laitiers. *C. R. Acad. Agric. de France*, 1952, 39, 609-615.

[11] Jago (G. R.). — Factors influencing the lactic acid producting properties of streptococci used in manufacture of Cheddar cheese. *J. Dairy Res.*, 1951, 21, 111-121.

[12] Jepsen (A.) et Overby (A. J.). — The disturbing effects of penicillin-milk in dairy industry and some proposals of technical methods for the elimination of failures. (Troubles apportés au lait par la pénicilline et moyens d'y remédier.) *Neth. Milk and Dairy J.*, 1951, 5, 157.

[13] Kakavas (J. C.). — Penicillin in the treatment of bovine mastitis. *North Amer. Vet.*, 1944, 25, 408.

[14] Katznelson (H.) et Hood (E. G.). — Influence of penicillin and other antibiotics on lactic streptococci in starter cultures used in Cheddar cheese making. *J. Dairy Sci.*, 1949, 32, 961.

[15] Kosikowski (F. V.) et Mocquot (G.). — A technique to increase sensivity of the Disc Assay Method for antibiotics in milk. *Comptes rendus, XIV^e Congrès international du lait et de ses dérivés*, 1956, 3, 203-211.

[16] Lemoigne (M.), Sanchez (G.) et Girard (H.). — Caractérisation de la pénicilline et de la streptomycine dans le lait. *Le Lait*, 1953, 33, 15-16.

[17] Meewes (K. H.) et Milosevic (S.). — Sur l'aptitude du lait contenant de la pénicilline à la fabrication du Camembert. *Milchwirtschaft. Forsch.*, 1954, 6, 393-407.

[18] Mocquot (G.), Chevalier (R.), Barnier (R.), Auclair (J.) et Alais (C.). — Etudes sur le dépistage des mammites et leur traitement par la pénicilline dans la région du Gruyère. *C. R. Acad. Agric. de France*, 1949, 35, 30.

[19] Neal (C. E.) et Calbert (H. E.). — The use of 2, 3, 5 triphenyltetrazolium chloride as a test for antibiotic substances in milk. *J. Dairy Sci.*, 1955. 38, 629-633.

[20] Ovejero (S.), Diez (M.) et Pascual (R.). — Influence de divers antibiotiques sur la fabrication du fromage « demi-dur Léonais ». *Le Lait*, 1954, 34, 22, 24.

[21] Overby (J. A.). — Effets de divers antibiotiques sur une souche lactique du commerce. *Nordisk Veterinaer Medicin*, 1952, 4, 993-1004.

[22] Overby (J. A.). — Antibiotics in milk. A rewiew. *Dairy Sci. Abst.*, 1954, 16, 2-23.

[23] Pien (J.), Lignac (J.) et Claude (P.). — Détection biologique des antiseptiques et des antibiotiques dans le lait. *Le Lait*, 1953, 33. 369-386.

[24] Sanchez (G.) et Lamensans (A.). — Dosage simple et rapide de la pénicilline et de la streptomycine dans les solutions. les émulsions. les pommades. *Ann. Inst. Past.*, 1948, 74, 142.

[25] Storgards (T.) et Anderson (L.). — Experiments with penicillinase for the inactivation of Penicillin. *C. R. XIII^e Congrès international de Laiterie*. 1953, 3, 1188-1192.

[26] Storrs (F. C.) et Hiett-Brown (W.). — The incidence of penicillin in milk supplies. *J. Dairy Res.*, 1954, 21, 337-341.

[27] *Svenska Mejeritidningen*. 1950. 50. 561-564. Déclaration obligatoire des traitements à la pénicilline en Suède.

[28] Wesner (P.). — Penicillin in cheese milk and its inactivation with penicillinase. *C. R. XIII^e Congrès international de Laiterie*. 1953. 3. 1121-1129.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 9

CHAPITRE PREMIER. — *Notions de technologie fromagère* 13

I. Principes importants de la fabrication du fromage 13

II. Propriétés inhibitrices du lait 17

CHAPITRE II. — *Les antibiotiques dans le lait* 17

I. Voies d'introduction des antibiotiques dans le lait 17

II. Durée nécessaire pour l'élimination des antibiotiques dans le lait 20

III. Conséquence des traitements : les laits antibiotés 22

a) Sensibilité des bactéries aux antibiotiques 23

b) Comment se manifestent les antibiotiques 28

IV. Concentrations critiques en antibiotiques dans le lait de fromagerie 31

Chapitre III. — *Recherche des antibiotiques dans le lait* 35

I. Méthode de G. Sanchez et A. Lamensans 36

II. Méthode de M. Lemoigne, G. Sanchez et H. Girard 38

III. Méthode de Pien-Lignac et Claude 41

IV. Méthode de J. Jacquet et M^me^ L. Steeg . 43

V. Méthode du test d'activité des levains 44

VI. Méthode des disques de papier 47

Chapitre IV. — *Comment se défendre contre les laits à antibiotiques* 53

I. Souches de levain résistantes 54

II. Pénicillinase 55

III. Réserver le lait contaminé aux usages de la ferme 61

IV. Ségrégation du lait avant le ramassage . . . 62

Chapitre V. — *Conclusions* 65

Bibliographie 71